

Rec'd PCT/PTO 14 JAN 2005

PCT/KR 03/01400

RO/KR 15.07.2003

10/521313

REC'D 06 AUG 2003

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

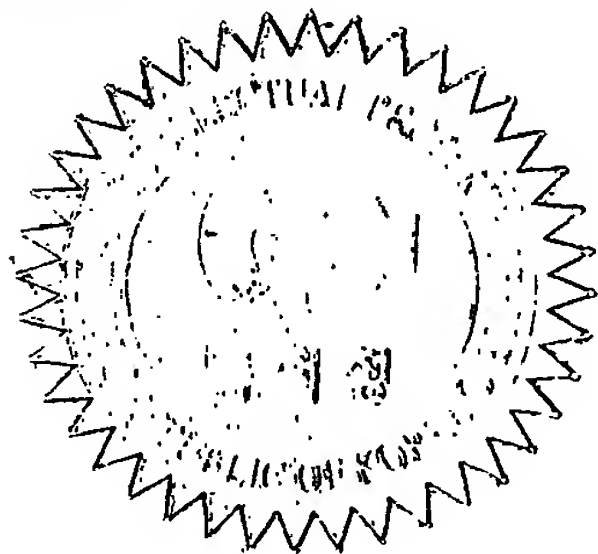
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0041764
Application Number

출원년월일 : 2002년 07월 16일
Date of Application JUL 16, 2002

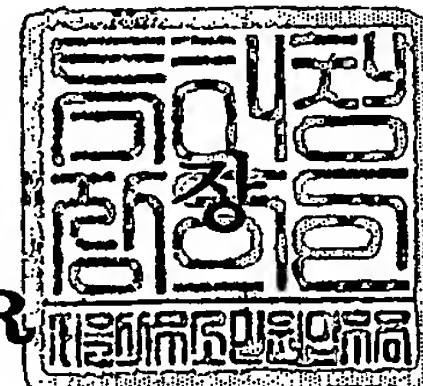
출원인 : 주식회사 팬제노믹스
Applicant(s) PanGenomics Co., Ltd.



2003 년 07 월 03 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.07.16
【발명의 명칭】	항암효과를 갖는 Her-2/neu DNA 백신
【발명의 영문명칭】	Her-2/neu DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER EFFECT
【출원인】	
【명칭】	주식회사 팬제노믹스
【출원인코드】	1-2001-027094-7
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-038590-8
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-038588-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이준엽
【성명의 영문표기】	LEE, Joon Youb
【주민등록번호】	740417-1001628
【우편번호】	135-110
【주소】	서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 76-503
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김동현
【성명의 영문표기】	KIM, Dong-Hyeon
【주민등록번호】	780627-1009412
【우편번호】	142-106
【주소】	서울특별시 강북구 미아6동 1267-329호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

정연석

【성명의 영문표기】

CHUNG, Yeonseok

【주민등록번호】

740807-1543114

【우편번호】

135-110

【주소】

서울특별시 강남구 압구정동 한양아파트 10-303

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

장선영

【성명의 영문표기】

CHANG, Sun-Young

【주민등록번호】

751004-2792914

【우편번호】

156-010

【주소】

서울특별시 동작구 신대방동 602-15 5층

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이경철

【성명의 영문표기】

LEE, Kyung-chul

【주민등록번호】

750610-1055615

【우편번호】

137-049

【주소】

서울특별시 서초구 반포본동 반포아파트 111-203

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

강창을

【성명의 영문표기】

KANG, Chang-Yui

【주민등록번호】

541128-1105113

【우편번호】

137-060

【주소】

서울특별시 서초구 방배동 대우 효령아파트 104-502

【국적】

KR

【미생물기탁】

【기탁기관명】

한국 미생물 보존센터

【수탁번호】

KCCM-10393

【수탁일자】

2002.06.26

【미생물기탁】

【미생물기탁】
 【기탁기관명】 한국 미생물 보존센터
 【수탁번호】 KCCM-10394
 【수탁일자】 2002.06.26

【미생물기탁】
 【기탁기관명】 한국 미생물 보존센터
 【수탁번호】 KCCM-10395
 【수탁일자】 2002.06.26

【미생물기탁】
 【기탁기관명】 한국 미생물 보존센터
 【수탁번호】 KCCM-10396
 【수탁일자】 2002.06.26

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 9

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 실 (인) 대리인
 장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 27 면 27,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 56,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 28,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

세포내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자를 포함하는 항암 효과를 갖는 플라스미드, 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 백신에 관한 것으로, 본 발명의 Her-2/neu DNA 백신은 우수한 항암효과를 가지므로 암 수술 후 전이를 감소시키는 치료 백신 및 유전적으로 위험성이 있는 사람을 위한 예방적 백신으로서 유용하게 응용될 수 있다.

【대표도】

도 1a

【명세서】

【발명의 명칭】

항암효과를 갖는 H e r -2/ n e u D N A 백신{Her-2/neu DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER EFFECT}

【도면의 간단한 설명】

도 1a 및 1b는 각각 pNeu 플라스미드의 제조 과정(A) 및 이를 이용한 마우스의 면역 일정(B)을 나타낸 것이고,

도 2a 내지 2e는 각각 pTV2, pNeu_{TM}, pNeu_{ECD}, pNeu_{TM}-gDs 및 pNeu_{ECD}-gDs 플라스미드들에 의해 유도되는 항체 반응을 나타낸 것이고(백색 히스토그램: 대조항체; 및 흑색 히스토그램: 시험군의 희석혈청),

도 3a 내지 3e는 각각의 플라스미드에 의해 유도되는 Her-2/neu 특이적인 항체 반응을 비교분석한 그래프이고(A: PBS; B: pNeu_{ECD}; C: pNeu_{TM}; D: pCK_{ECD}; 및 E: pCK_{TM}; 및 백색 히스토그램: 대조항체; 흑색 히스토그램: 시험군 혈청),

도 4a 내지 4c는 각각 pTV2, pNeu_{TM} 및 pNeu_{ECD}-gDs로 면역화한 마우스 혈청의 공초점주사 현미경 분석 결과이고,

도 5a 내지 5e는 각각 pTV2, pNeu_{TM}, pNeu_{ECD}, pNeu_{TM}-gDs 및 pNeu_{ECD}-gDs 플라스미드들에 의해 유도되는 세포 독성 T 림프구 반응을 나타낸 그래프이고,

도 6a 내지 6e는 각각의 플라스미드에 의해 유도되는 세포독성 T 림프구 반응을 비교 분석한 그래프이고(A: PBS; B: pNeu_{ECD}; C: pNeu_{TM}; D: pCK_{ECD}; 및 E: pCK_{TM}),

도 7a 및 7b는 pNeu 플라스미드들에 의한 예방적 항암효과를 나타낸 것으로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her-2/CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기(7A) 및 Her-2/CT26 세포를 정맥주사한 경우의 마우스의 생존률(7b)을 시간 경과에 따라 나타낸 것이고,

도 8a 및 8b는 pCK_{ECD} 및 pCK_{TM} 플라스미드에 의해 유도되는 예방적 항암효과를 비교하여 나타낸 그래프로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her-2/CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기(8a) 및 Her-2/CT26 세포를 정맥주사한 경우의 마우스의 생존률(8b)을 시간 경과에 따라 나타낸 것이고,

도 9a 및 9b는 pNeu_{ECD} 및 pNeu_{ECD}-gDs 백신 투여에 의해 유도되는 예방적 항암효과를 비교하여 나타낸 그래프로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her-2/CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기(9a) 및 Her-2/CT26 세포를 정맥주사한 경우의 마우스의 생존률(9b)을 시간 경과에 따라 나타낸 것이고,

도 10a 및 10b는 pNeu_{ECD} 및 pNeu_{ECD}-gDs 백신 투여에 의해 유도되는 암 치료 효과를 비교하여 나타낸 그래프로서, 10a 및 10b는 각각 Her-2/CT26 세포를 1×10^5 개 또는 5×10^5 개로 정맥주사한 후 각 플라스미드를 투여한 마우스의 생존률을 시간 경과에 따라 나타낸 것이고,

도 11은 pCK_{ECD} 및 pCK_{TM} 플라스미드에 의해 유도되는 암치료 효과를 비교하여 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <12> 본 발명은 인간 Her-2/neu DNA를 포함하고 항암 효과를 갖는 플라스미드 및 이를 포함하는 백신에 관한 것이다.
- <13> Her-2/neu 유전자는 성장인자 수용체의 타입 I 군에 속하는, 크기가 185 kDa인 막 관통 단백질을 생성하게 한다(Akiyama, T., et al., *Science*, 232: 1644-1646(1986) 및 Bargmann, C. I., et al., *Nature*, 319: 226-230(1986)). 이 유전자의 증폭은 185 kDa의 타이로신 키나아제를 과다 발현하게 하며 표피 성장 인자 수용체와 유사하다(Coussens, L., et al., *Science*, 230: 1132-1139(1985); Stern, D. F., et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 1729-1740(1986); 및 Kraus, M. H., et al., *Embo. J.*, 6: 605-610(1987)).
- <14> Her-2/neu 단백질은 유방암과 난소암과 같은 수종의 선암에서 증폭되어 과다 발현되고 있는 것으로 알려져 있다(Kraus, M. H. 등 상기 문헌; Slamon, D. J., et al., *Science*, 244: 707-712(1989); 및 Yonemura, Y., et al., *Cancer Res.*, 51: 1034-1038(1991)). Her-2/neu의 과다발현은 유방암 환자에서 단기 재발, 나쁜 예후와 상당한 관련이 있으며(Slamon, D. J., et al., *Science*, 235: 177-182(1987); Press, M. F., et al., *Cancer Res*, 53: 4960-4970(1993); 및 Seshadri, R., et al., *J. Clin. Oncol.*, 11: 1936-1942(1993)), 과다 발현 자체로도 암 발병과정에서 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다. Her-2/neu는 그것을 발현하는 암의 병인과 임상적인 경과에 직

접적인 역할을 한다는 증거도 있다(Baselga, J., et al., *Semin. Oncol.*, 26: 78-83(1999)). 또한 Her-2/neu 특이적인 항체와 T 림프구도 유방암과 난소암 환자에서 발견되고 있다(Disis, M. L., et al., *Cancer Res*, 54: 16-20(1994); Disis, M. L., et al., *J. Clin. Oncol.*, 15: 3363-3367(1997); Peoples, G. E., et al., , U S A, 92: 432-436(1995); Kono, K., et al., *Int. J. Cancer*, 70: 112-119(1997); Kobayashi, H., et al., *Cancer Res*, 60: 5228-5236(2000); 및 Charo, J., et al., *J. Immunol.*, 163: 5913-5919(1999)). 그러므로, Her-2/neu 종양형성유전자는 그것을 과다 발현하는 암에 특이적인 치료 백신의 개발에서 좋은 표적이 될 수 있다.

<15> 인간 Her-2/neu 분자는 세포내 영역에 타이로신 키나아제 활성을 가지고 있고 그 분자의 과다 발현 자체만으로도 세포의 비정상적인 분열이 촉진되어 발암의 가능성이 높다는 사실은 잘 알려져 있다(Coussens, L., et al., *Science*, 230: 1132-1139(1985); Stern, D. F., et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 1729-1740(1986); 및 Kraus, M. H., et al., *Embo. J.*, 6: 605-610(1987)). 따라서, 세포내 키나아제 활성부위에 돌연변이를 일으켜 활성을 억제하거나(Wei, W. Z., et al., *Int. J. Cancer*, 81: 748-754(1999)) 세포의 영역 혹은 세포내 영역을 제거한 분자를 이용하여 전체 분자를 백신에 이용하였을 때 나타날 수 있는 발암성을 억제하고자 하는 시도가 있었다.

<16> 플라스미드는 비교적 생산하기 쉽고 안전하므로 암관련 항원을 표적으로 하는 항암 백신의 개발에서 좋은 벡터가 될 수 있다. 플라스미드는 단백질도 아니고 바이러스성 피막도 없으므로 백신의 임상적인 효과를 저해하는 중화 항체를 생성시키지 않는다

(Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E., *J. Immunother*, 21: 119-126(1998) 및 Minev, B. R., *Pharmacol Ther*, 81: 121-139(1999)).

<17> 전임상 암 모델에서 랫트 Her-2/neu(Chen, Y., et al., *Cancer Res.*, 58: 1965-1971(1998); Amici, A., et al., *Gene Ther*, 7: 703-706(2000); Rovero, S., et al., *J. Immunol.*, 165: 5133-5142(2000)) 또는 인간 Her-2/neu(Foy, T. M., et al., *Vaccine*, 19: 2598-2606(2001); Piechocki, M. P., et al., *J. Immunol.*, 167: 3367-3374(2001); 및 Pilon, S. A., et al., *J. Immunol.*, 167: 3201-3206(2001)) 유전자 DNA 백신은 Her-2/neu를 과다 발현하는 암세포에 대해 예방적인 효과를 나타내었다.

<18> 이렇게 Her-2/neu DNA 백신에 의해 Her-2/neu를 발현하는 암세포에 대한 항암 효과를 보인 사례(Amici, A. 등, 상기 문헌; Rovero, S. 등, 상기 문헌; Pupa, S. M., et al., *Gene Ther*, 8: 75-79(2001); Lachman, L. B., et al., *Cancer Gene Ther*, 8: 259-268(2001); 및 Wei, W. Z., et al., *Int. J. Cancer*, 81: 748-754(1999)))는 그 전에도 있었지만 성공적인 치료 효과를 보고한 경우는 없었다. Her-2/neu 플라스미드에서 항원이 발현되기까지 상당한 시간이 소요되어 항암 효과가 늦게 나타나기 때문에 치료 효과를 보기가 어려우며, 더욱이 유방암 세포는 비교적 성장 속도가 빠르다. 따라서, 일부 Her-2/neu 치료 백신 연구는 세포를 이용하거나(Valone, F. H., et al., *Cancer J.*, 7, Suppl 2: S53-61(2001)), DNA와 사이토카인을 분비하는 암세포를 함께 이용하거나(Chen, S. A., et al., *Clin Cancer Res*, 6: 4381-4388(2000)), 수상돌기세포를 이용하는 경우(Chen, Y., *Gene Ther*, 8: 316-323(2001))가 많았다.

<19> 이에 본 발명자들은 암 치료에 효과적으로 이용할 수 있는 Her-2/neu DNA 백신을 제조하기 위해 계속 연구를 진행하던 중, 매우 우수한 항암 치료 및 예방 효과를 갖는 인간 Her-2/neu 유전자 DNA 백신을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<20> 본 발명의 목적은 우수한 항암 효과가 있는 인간 Her-2/neu 발현 플라스미드를 제공하는 것이다.

<21> 본 발명의 다른 목적은 상기 플라스미드를 유효성분으로 하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

<22> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라스미드를 유효성분으로 하는 암의 예방 또는 치료용 백신을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<23> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 세포 내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자를 플라스미드 pTV2 또는 pCK에 삽입하여 제조된, 항암 효과를 갖는 플라스미드를 제공한다.

<24> 세포내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자는 바람직하게는 서열번호: 2의 염기 서열을 가지며, 이 유전자를 생체내에서 발현효율이 높은 플라스미드 pTV2(Lee, S. W. et. al., *J. Virol.*, 72: 8430-8436(1998)) 또는 pCK(기탁번호: KCCM-10179)에, 바람직

하계는 *KpnI*과 *XbaI*(gDs가 포함되지 않은 경우) 부위 또는 *AscI*과 *XbaI*(gDs가 포함된 경우) 부위에 삽입하여 본 발명의 플라스미드를 제조할 수 있다.

<25> 본 발명의 플라스미드에 포함된 인간 Her-2/neu 유전자로부터 세포내 영역을 제거함으로써 다음과 같은 잇점을 기대할 수 있다. 즉, Her-2/neu의 세포내 키나아제 영역을 제거하여 이에 의해 유발되는 비정상적인 성장 신호 전달을 차단함으로써 정상 세포가 암세포로 변할 수 있는 기회를 제거하여 Her-2/neu의 발암성을 없앨 수 있다. 또한 표피세포 성장 인자 수용체 군과 펩타이드 서열이 매우 유사한 세포 내 영역을 제거함으로써 자가면역반응의 위험성을 피할 수 있을 것으로 추측된다. 발암성과 자가면역반응의 위험을 배제하기 위해 세포 내 영역을 제거한 Her-2/neu를 이용하여 DNA 백신을 시도한 선행 연구가 있으나(Chen, Y., et al., *Cancer Res.*, 58: 1965-1971(1998); Amici, A., et al., *Gene Ther.*, 7: 703-706(2000)), 이들은 우수한 항암 효과를 나타내지 못했다. 반면에, 본 발명의 플라스미드는 항체 반응과 세포독성 T 림프구 반응 모두를 잘 유도하여 우수한 항암 효과를 나타내며, 특히, 전이암에 대해서도 치료 효과를 나타낸다

<26> 본 발명의 상기 플라스미드로부터 Her-2/neu 유전자의 막관통 영역을 추가로 제거하여 서열번호: 3의 염기서열을 갖는 유전자를 포함하는 플라스미드를 제조할 수 있는데, 막관통 영역의 제거로 인해 단백질이 세포 외로 분비되는 효과가 있다.

<27> 본 발명의 플라스미드는 또한 면역 반응을 보다 잘 유도할 수 있도록 인간 Her-2/neu 유전자 고유의 신호서열을 외래의 신호서열로 치환하여 제조할 수도 있는데, 외래의 신호 서열로는 인간 면역결핍바이러스(HIV) 타입 I gp160의 발현과 분비를 용이

하게 하는 것으로 알려진 허피스 심플렉스 타입 I 당단백질 D(gD) 신호 서열을 사용할 수 있다.

<28> 본 발명의 플라스미드 중 바람직한 것들은 세포내 영역이 제거된 Her-2/neu 유전자를 pTV 및 pCK 벡터에 각각 삽입하여 제조된 플라스미드 pNeu_{TM} 및 pCK_{TM}, 이들로부터 Her-2/neu 유전자의 막관통 영역을 제거한 플라스미드 pNeu_{ECD} 및 pCK_{ECD}, 및 플라스미드 pNeu_{TM} 및 pNeu_{ECD}에서 Her-2/neu 유전자 고유의 신호 펩타이드 서열을 허피스 심플렉스 바이러스 타입 1의 당단백질 D(gD) 신호 서열로 치환한 플라스미드 pNeu_{TM}-gDs 및 pNeu_{ECD}-gDs이다.

<29> 상기 플라스미드 pNeu_{TM}, pCK_{TM}, pNeu_{ECD} 및 pCK_{ECD}는 2002년 6월 26일자로 한국 미생물 보존센타에 각각 기탁번호 제 KCCM-10393 호, 제 KCCM-10396 호, 제 KCCM-10394 호 및 제 KCCM-10395 호로서 기탁하였다.

<30> 이들 플라스미드를 BALB/c 마우스에 투여하면 신호 펩타이드 서열에 따라 Her-2/neu 특이적인 IgG 항체를 유도하는 양상이 달라지는데, 구체적으로 pNeu_{TM}와 pNeu_{ECD}를 투여한 마우스의 혈청은 Her-2/neu 특이적인 IgG 항체의 역가가 매우 높은 반면, pNeu_{TM}-gDs와 pNeu_{ECD}-gDs의 경우는 대조적으로 낮다. 한편, 모든 플라스미드들은 Her-2/neu에 대한 강한 세포독성 T 림프구 반응을 유도한다. 이에 이러한 플라스미드를 이용하여 Her-2/neu를 발현하는 암세포를 제거하는데 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구와 항체의 상대적인 중요성을 살펴본 결과, 모든 플라스미드들은 적은 양의 암세포에 대해서는 완벽하게 거부반응을 보이며, 또한 암의 예방 및 치료 모델에서도 pNeu_{ECD}와 pNeu_{ECD}-gDs의 항암 효과는 유의적인 차이를 보이지 않음을 알 수 있다. 반면,

치료 모델에서 암세포의 양을 늘릴 경우에는 pNeu_{ECD}만이 통계적으로 유의적인 항암 효과를 나타낸다. 이러한 연구들은 강한 세포독성 T 림프구 반응으로도 암 예방에는 충분하지만, 암의 치료에 있어서는 세포독성 T 림프구와 항체 모두가 필요하다는 것을 뒷받침해 준다.

- <31> 한편, 플라스미드 pCK_{TM}과 pCK_{ECD}는 플라스미드 pNeu_{TM} 및 pNeu_{ECD}와 거의 동등한 효과를 보이며, 이러한 결과로부터 항암 치료 백신으로서 본 발명의 플라스미드들을 임상적으로 사용할 수 있음을 알 수 있다.
- <32> 본 발명의 플라스미드를 포함하는 조성물은 암 수술 후 전이를 감소시키는 치료 백신 및 유전적으로 위험성이 있는 사람을 위한 예방적 백신으로서 유용하게 응용될 수 있다.
- <33> 본 발명의 의학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화 할 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

또한 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다.

<34> 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화할 수 있다.

<35> 유효 성분으로서 플라스미드는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.2 내지 10 mg/kg(체중), 바람직하게는 4 내지 5 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

<36> 이하 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<37> 참조예 1: 세포주와 실험동물

<38> Her-2/neu를 발현하는 인간유방암 SK-BR3 세포주와 마우스의 결장선암종 세포주인 CT26은 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다(ATCC HTB-30 및 CRL-2639). 인간 유방암 세포주 SK-BR3 세포들은 10% 열불활성화 우태아혈청(GIBCO, Gaithersburg, MD), 1% 페니실린-스트렙토마이신(GIBCO)을 넣은 RPMI1640(BioWhittaker, Walkersville, MD)배지에서 배양하였다. Her-2/neu를 발현하는 이입세포 Her-2/CT26 세포주는 인간 Her-2/neu를 암호화하는 cDNA(NCBI: M11730)로 CT26 세포에 이입하여 제조하였다. Her-2/CT26과

CT26 세포들은 10% 열불활성화 우태아혈청(GIBCO, Gaithersburg, MD), 1% 페니실린-스트렙토마이신(GIBCO)을 함유한 IMDM(BioWhittaker) 배지에서 배양하였다.

<39> 5주령된 암컷 BALB/C 마우스들은 찰스리버사(오사카, 일본)에서 구입하여 12시간 주야주기에서 22℃, 상대습도 55%를 유지하며 사육하였고, 사료와 물은 제한없이 공급하였다. 마우스들은 서울대학교 약학대학 실험동물센터에서 사육하였고, 전체 실험기간 동안 무균분리기에서 유지되었다.

<40> 참조예 2: 근육주사를 위한 DNA 플라스미드의 제조

<41> pNeu_{TM}, pNeu_{ECD}, pNeu_{TM}-gDs, pNeu_{ECD}-gDs, pCK_{TM}, pCK_{ECD} 및 대조 플라스미드 pTV2 및 pCK로 형질 전환한 대장균 DH5(*Escherichia coli* strain DH5)를 LB 배지 (Difco, Detroit, MI)에서 배양하였다. 플라스미드 DNA의 대량생산은 엔도프리 퀴아젠 플라스미드-기가 키트(Endofree Qiagen Plamid-Giga Kits, Qiagen, Chatsworth, CA)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 생산하였다. DNA를 침전시킨 다음 멸균 PBS에 2 mg/ml의 농도로 현탁시키고 투여 일정에 따라 사용 시까지 -20 °C에서 보관하였다.

<42> 참조예 3: 유세포분석(Flow Cytometry, FACS)

<43> 혈청 중의 항체가 Her-2/neu 표면단백질과 반응하는지를 시험하기 위하여, SK-BR3, Her-2/CT26, CT26을 세포 스크래퍼(cell scraper, Nunc, Naperville, IL)를 이용하여 배양플라스크에서 떼어냈다. 떼어낸 세포들은 RPMI1640, 2% 우태아혈청, 0.1% 소듐 아자이드가 함유된 완충액으로 세척하였다. 각각 약 2×10^5 의 세포들을 혈청 또는 대조

항체의 연속 희석액과 함께 4 °C에서 30 분간 반응시켰다. 배양한 세포들은 다시 완충액으로 3 회 세척한 다음 마우스 IgG에 특이적인 FITC-접합 염소 단클론 항체(Sigma)와 4 °C에서 30 분간 염색하였다. 염색된 세포들은 완충액으로 2 회 세척한 다음 완충액으로 재현탁하였다. 데이터에서 죽은 세포를 제외하기 위하여, 세포현탁액에 1 µg/ml 프로피디움 아이오다이드(Sigma)를 넣어 분석 전에 5 분간 배양하였다. 프로피디움 아이오다이드 염색에서 음성으로 판정된 세포들만을 분류하여 종양 세포들에 대한 결합의 분석에 이용하였다. 유세포분석은 PAS III 유세포분석기(Partec GmbH, Munster, Germany)를 이용하여 실시하였다.

<44> 참조예 4: 항Her-2/neu 항체에 대한 공초점주사 현미경(Confocal microscopy) 분석

<45> 약 1×10^5 의 SK-BR3 세포들을 1 mg/mL 폴리-L-리신이 도포된 Lab-Tek 챔버 커버글래스(Nunc, Naperville, IL)에서 3 일간 배양하였다. 세포들은 4% 파라포름알데히드를 함유한 PBS 용액으로 실온에서 10 분간 처리하여 고정하고, DMEM(BioWhittaker, Walkersville, MD) 배지로 3 회 세척하고, 1% 염소-글로불린을 함유한 DMEM으로 4 °C에서 1 시간동안 차단하고, 차단용액에서 1:50 희석 마우스 혈청으로 4 °C에서 8 시간동안 배양하고 세척한 다음 R-피코에리트린-접합 염소 항마우스 면역글로불린 2차 항체(Southern Biotech, Birmingham, AL)와 실온에서 30분간 배양하였다. 슬라이드는 젤/마운트 배지(Gel/Mount media, Fisher)에 넣은 다음 공초점주사 현미경(Leica TCS-SP laser scanning microscopy)를 이용하여 시험하였다.

<46> 참조예 5: DNA 면역화법

<47> 모든 마우스에 멸균 PBS 100 μ l에 용해된 100 μ g의 플라스미드 DNA를 뒷 다리 2개에 나누어 근육주사하였다. 주사부위는 부피바카인-HCl(bupivacaine-HCl, ASTRA, Westborough, MA)로 전처리하여 마취하였다. 치료 백신에 대한 매일의 면역화법에서는 부피바카인-HCl을 첫 번째 면역화 직전에 한 차례만 전처리하였다. 혈청은 정해진 시간에 취하여 항 Her-2/neu 항체의 존재 여부를 측정하였다.

<48> 참조예 6: 크롬-방출 분석

<49> 마우스로부터 비장을 얻어 비장세포를 얻고 마이토마이신 C(Sigma)를 처리한 Her-2/CT26 세포와 6일동안 배양하였다. Her-2/CT26 또는 CT26 종양 표적 세포들은 2×10^6 개의 세포들과 200 uCi의 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ 를 200 μ l의 생리식염수에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 90 분간 배양하여 ^{51}Cr 을 표지하였다. 세포에 표지되지 않은 ^{51}Cr 은 RPMI1640으로 4 회 세척하여 제거하였다. 6일 배양 후 단계별로 희석한 마우스 비장 세포들은 10% 우태아혈청을 함유한 RPMI에 현탁하여 바닥이 둥근 미세적정판(round-bottom microtiter plate)에서 ^{51}Cr 이 표지된 10,000개의 표적 세포들과 혼합하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간동안 배양하였다. 배양액을 100 μ l씩 취하여 섬광계측기(Packard, Minaxi Auto Gamma 5000 Series)에서 측정하였다. 용해된 백분율은 다음과 같이 계산하였다:

<50> 【반응식 1】

특이적 용해 % = $100 \times [(\text{실험군의 cpm} - \text{자연용해군의 cpm}) / (\text{완전용해군의 cpm} - \text{자연용해군의 cpm})]$.

<51> 완전 용해군의 cpm은 ^{51}Cr -표지 표적 세포들에 5 % 트리톤-X(Sigma) 10 μl 를 가하여 얻은 배양액을 측정하여 결정되었다. 각 집단은 이중(duplicate)으로 시험하였다. 이 때 자연 용해군의 cpm은 비장 세포나 트리톤-X를 가하지 않고 동량의 배지만을 가하여 얻은 배양액을 측정하여 결정하였다.

<52> 참조예 7: 종양 공격

<53> 멸균 PBS에 현탁한 Her2-CT26 세포들을 옆구리에 피하 주사하거나 정맥 주사하여 마우스들을 공격하였다. 종양들은 측경기(caliper)를 이용하여 3 차원으로 측정하였고, 부피는 다음의 식을 이용하여 계산하였다:

<54> 【반응식 2】

$$\text{종양부피} = (\text{너비} \times \text{길이} \times \text{두께}) \text{ m}^3 \times (1/2)^3 \times 4\pi/3.$$

<55> 촉진으로 종양을 발견하기 위하여 일주일에 두 번씩 동물들을 관찰하였다. 심한 통증, 호흡곤란, 운동장애를 나타내는 마우스는 희생시켰다.

<56> 실시예 1: Her-2/neu를 발현하는 플라스미드의 제작

<57> 전체의 인간 Her-2/neu 유전자를 암호화하는 cDNA(서열번호: 1)를 pRc/CMV(입수처: Invitrogen Life technologies)의 *HindIII*와 *XbaI* 부위에 삽입하여 완전한 형태의 Her-2/neu 플라스미드를 제조하였다(9.6 Kb).

- <58> Her-2/neu의 세포 내 영역 및 막관통 영역 없이 Her-2/neu의 세포 외 영역을 포함하는 플라스미드 pNeuECD 및 pCKECD는 서열번호: 4의 NF6 시발체 및 서열번호: 5의 NSR1 시발체와 주형으로서 상기에서 제조된 완전한 형태의 Her-2/neu 플라스미드(9.6 Kb)를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR) 생성물을 만든 다음에 플라스미드 pTV2(Lee, S. W. et. al., *J. Virol.*, 72, 8430-8436(1998))와 pCK(Lee Y., et. al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 272, 230-235(2000); 기탁번호: KCCM-10179)의 *KpnI*과 *XbaI*의 위치에 각각 삽입하여 제조하였다. 이 때 PCR 반응은 94℃에서 2분 수행하고, 94℃에서 15초, 55℃에서 30초 및 68℃에서 3분 30초로 이루어진 반응을 모두 25회 반복한 후 72℃에서 7분 동안 반응시켰다.
- <59> 또한, Her-2/neu의 세포 내 영역없이 세포 외 영역과 막관통 영역을 포함하는 플라스미드 pNeu_{TM}과 pCK_{TM}은 서열번호: 6의 NF5 시발체와 서열번호: 7의 NRM2 시발체를 이용하는 것을 제외하고는 상기와 동일하게 PCR을 실시하여 얻은 PCR 생성물을 pTV2와 pCK의 *KpnI*과 *XbaI*의 위치에 각각 삽입하여 제조하였다(도 1a).
- <60> 이어서, Her-2/neu의 세포 내 영역과 막관통 영역없이 Her-2/neu의 세포 외 영역을 포함하며 Her-2/neu 유전자의 신호서열 대신 허피스 심플렉스 바이러스 타입 I형 당단백질 D(gD)의 신호서열을 포함하는 플라스미드 pNeuECD-gDs는 서열번호: 6의 NSF2 시발체와 서열번호: 5의 NSR1 시발체를 이용하는 것을 제외하고는 상기와 동일하게 PCR을 실시하여 얻은 PCR 생성물을 pTV2-gDs(pTV2 벡터에 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I형 당단백질 D(gD)의 신호서열을 클로닝한 발현 벡터)의 *KpnI*과 *XbaI*의 위치에 삽입하여 제조하였다. 또한, Her-2/neu의 세포 외 영역과 막관통 영역을 포함하며 Her-2/neu 유전자의 신호서열 대신 gD의 신호서열을 포함하는 플라스미드 pNeu_{TM}-gDs은 서열번호: 9의 NF3

시발체와 서열번호: 7의 NRM2 시발체를 이용하는 것을 제외하고는 상기와 동일하게 PCR을 실시하여 얻은 PCR 생성물을 pTV2-gDs의 *AscI*과 *XbaI*의 위치에 삽입하여 제조하였다(도 1a).

<61> 실시예 2: Her-2/neu DNA 백신에 의한 Her-2/neu 특이적인 항체의 유도

<62> 다양한 pNeu 플라스미드 DNA가 Her-2/neu 특이적인 항체를 유도할 수 있는지를 다음과 같은 방법으로 시험하였다. 참조예 1에서와 같이 준비된 각각의 마우스에 투여 계획에 따라 100 μ g의 플라스미드 DNA를 3회 근육 주사하였다(도 1b). 각 그룹 중 일부의 마우스는 비장을 얻어 Her-2/neu 특이적 세포독성 T 림프구 반응을 측정하였으며, 나머지 마우스에는 Her-2/neu를 발현하는 암세포를 투여하여 항암 면역 정도를 측정하였다.

<63> 첫 번째 주사하기 전과 세 번째 주사 후 7일이 지난 뒤에 마우스로부터 혈청을 얻었다. 혈청 중에 존재하는 항체가 유방암 세포주인 SK-BR3 세포와 결합하는 정도를 참조예 3과 같이 유세포 분석기(flow cytometry)로 측정하여 혈청 중에 존재하는 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가를 계산하였다. pNeu_{TM}, pNeu_{TM}-gDs, pNeu ECD 또는 pNeuECD-gDs을 접종한 모든 마우스의 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가를 측정하였으며, Her-2/neu에 결합력이 없는 대조항체의 경우와 비교하여 인간 유방암 SK-BR3 세포주와의 결합에 의한 평균 형광 세기의 이동이 나타나는 혈청의 최대 희 배수를 구하여 하기 표 1에 나타내었다.

<64>

【표 1】

pTV2 (n=5)	pNeu _{TM} (n=5)	pNeu _{ECD} (n=5)	pNeu _{TM} -gDs (n=5)	pNeu _{ECD} -gDs (n=5)
< 50	12800	12800	800	< 50
< 50	12800	12800	50	< 50
< 50	3200	12800	< 50	< 50
< 50	12800	12800	800	< 50
< 50	3200	12800	50	< 50

<65> 그 결과, 상기 표 1에서 보듯이 혈청 중의 Her-2/neu 특이적인 항체 IgG의 역가는 pNeu_{ECD} > pNeu_{TM} pNeu_{TM}-gDs > pNeu_{ECD}-gDs >> pTV2 순서로 나타났다. 플라스미드 DNA를 접종하기 전의 마우스로부터 얻은 혈청은 Her-2/neu 특이적인 결합력을 나타내지 않았다. 또한, 대조 벡터인 pTV2를 접종한 마우스에서 얻은 혈청의 경우에도 1:50의 희석배율에서 Her-2/neu 특이적인 항체에 의한 결합력이 나타나지 않았다(도 2a). 반면에 pNeu_{TM} 또는 pNeu_{ECD}를 접종한 마우스의 경우에는 높은 Her-2/neu 특이적인 IgG 역가를 나타냈으며, 혈청을 1:800으로 희석한 경우에 있어서도 평균 형광 세기가 폭 넓게 이동하였다(도 2b 및 2c). 이와는 대조적으로 pNeu_{TM}-gDs 또는 pNeu_{ECD}-gDs를 접종한 경우에는 매우 낮은 정도의 IgG 역가를 나타냈으며, 혈청을 1:50으로 희석한 경우에 있어서도 매우 낮아서 구분하기 어려울 정도의 평균 형광 세기의 변화만을 측정할 수 있었다(도 2d 및 2e). 플라스미드 pCK_{ECD}와 pCK_{TM}를 동일한 방법으로 3회 주사 후 10일째에 얻은 혈청을 1:400으로 희석한 경우에도 평균 형광 세기가 넓게 이동하여 Her-2/neu 특이적 항체가 잘 유도되고 있음을 확인하였다(도 3).

- <66> 또한, 공초점 주사현미경을 이용하여 참조예 4와 같이 pNeuTM 또는 pNeuECD-gDs로 면역화한 마우스 혈청 중의 Her-2/neu 특이적인 항체의 존재를 확인하였다. pNeuTM으로 면역화한 마우스의 혈청(도 4b)의 경우에는 대조 벡터인 pTV2(도 4a) 또는 pNeuECD-gDs(도 4c)로 면역화한 마우스 혈청과 비교해 볼 때, SK-BR3 세포 표면에 결합하는 Her-2/neu 특이적인 항체의 분포를 명확하게 관찰할 수 있었다. 이러한 사실은 도 2에 나타난 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가와 일치한다.
- <67> 실시예 3: Her-2/neu DNA 면역화에 의한 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응의 유도
- <68> 실시예 2에서와 같이 면역화에 사용한 pNeu 벡터의 종류에 따라 Her-2/neu 특이적인 항체 반응에 차이가 크므로, 동일한 마우스에서 유도된 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응을 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 혈청중의 Her-2/neu 특이적 항체의 역가를 측정한 마우스로부터 세번째 접종이 끝난 후 2주 뒤에 비장 세포를 얻었다. 비장 세포를 마이토마이신 C로 처리한 인간 Her-2/neu를 발현하는 동일 종 기원의 마우스 이입세포인 Her-2/CT26 세포와 6일 동안 함께 배양한 후에 4시간 동안 크롬 방출 실험을 통하여 CT26 또는 Her-2/CT26 표적세포의 세포용해 정도를 측정하였다. 결과적으로 pNeuTM(도 5b), pNeuECD(도 5c), pNeuTM-gDs(도 5d) 또는 pNeuECD-gDs(도 5e)로 면역화한 마우스로부터 얻은 비장세포는 대조 벡터인 pTV2(도 5a)만을 접종한 대조군 마우스의 비장세포에서는 나타나지 않는 세포독성 T 림프구 의존적인 Her-2/CT26 세포의 세포용해를 보였으며, Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응의 상대적인 세기를 나타내면 pNeu

$TM > pNeu_{ECD} > pNeu_{TM-gDs} > pNeu_{ECD-gDs} >> pTV2$ 와 같다. pNeu 벡터들은 E:T(effector:target) 비율 50:1에서 80~90%, 10:1에서 60~70%의 Her-2/neu 특이적인 세포용해도를 나타내고 있으며, pNeu 벡터들을 접종한 모든 마우스 비장세포에서 비슷한 정도를 보였다(도 5b 내지 5e). 반면에 어떤 그룹에서도 세포독성 T 림프구에 의한 CT26 세포의 용해는 관찰되지 않았다.

<69> pNeu_{ECD}와 pNeu_{TM}을 pCK 벡터로 치환시킨 pCK_{ECD}와 pCK_{TM}의 경우에도 Her-2/neu 특이적 세포독성 T 림프구 반응을 분석하였다(도 6). 도 6에서 보듯이, pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드의 경우에도 pNeu_{ECD}와 pNeu_{TM}과 유사한 정도로 세포독성 T 림프구 반응이 잘 유도되고 있으며 세포의 영역(ECD)만 있는 경우보다는 막관통 영역까지 포함하고 있는 경우(TM)가 좀더 우수한 것으로 확인되었다.

<70> 즉, 모든 Her-2/neu를 발현하는 플라스미드는 강한 Her-2/neu 특이적 세포독성 T 림프구 반응을 보이며, 이러한 반응은 신호 펩타이드 서열 및 벡터에 관계없이 나타났다. 그러나 신호 펩타이드 서열에 따라서 현저히 다른 Her-2/neu 특이적인 항체 반응을 나타냈으며, 이러한 결과는 수 차례에 걸친 동일한 실험을 통하여 확인하였다.

<71> 실시예 4: Her-2/neu DNA 백신에 의한 예방적 항암 효과 분석

<72> Her-2/neu를 발현하고 있는 동일 종 기원의 마우스 암세포주인 Her-2/CT26에 대한 항암 면역을 BALB/c 마우스에서 측정하였다. 우선 마우스에 피하 주사 또는 정맥 주사를 통해서 각각 피하 암 형성 또는 폐 전이 암이 형성되는 정도를 조절하기 위해서 적정 실험을 통해 주사할 최적의 암세포 수를 결정하였다. Her-2/CT26 세포를 5×10^4 개 세

포 이상 피하주사 또는 정맥주사 한 경우 피하 암 또는 폐 전이 암이 형성되었다. 오랜 생존이 Her-2/neu 플라스미드 DNA 간의 항암 면역능력을 구분하는데 유리하므로 피하주사 또는 정맥주사하는 세포의 수를 5×10^4 개로 결정하였다.

<73> 각각의 마우스에 면역화 계획에 따라 3회에 걸쳐 $100\mu\text{g}$ 의 플라스미드 DNA를 근육주사 하였으며(도 1b), 플라스미드 DNA의 3번째 접종이 끝난 후 10일이 지난 뒤 각각의 마우스에 5×10^4 개의 Her-2/CT26 세포를 피하주사 또는 정맥주사로 투여하였다. 피하 암 모델에 있어서 대조 벡터인 pTV2를 접종한 모든 마우스에서 뚜렷한 암이 형성되었다(도 7a). 반면에 pNeu_{TM}, pNeu_{TM}-gDs, pNeu_{ECD} 또는 pNeu_{ECD}-gDs를 접종한 그룹의 마우스는 암세포를 피하주사한 후에도 60일 동안 암이 완전히 억제되었다. 암전이 모델의 경우 pNeu_{TM}, pNeu_{TM}-gDs, pNeu_{ECD} 또는 pNeu_{ECD}-gDs를 접종한 그룹의 마우스들이 모두 암세포 정맥 주사 후 생존하였다(도 7b). 그러나 암전이 모델에서 pTV2만 접종한 마우스는 57%(4/7)가 죽었으며, PBS만 접종한 마우스의 경우에는 모든 마우스가 살아남지 못했다.

<74> 또한, pNeu_{ECD}와 pNeu_{TM}을 pCK 벡터로 치환시킨 pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드의 경우에도 3회에 걸쳐 $100\mu\text{g}$ DNA를 근육 주사하고 10일 후 1×10^6 개의 Her-2/CT26 세포를 피하 또는 정맥 주사하여 항암 효과를 시험하였다. Her-2/CT26을 피하 주사한 경우에는 PBS 그룹과 대조 벡터인 pCK 벡터를 투여한 그룹에서는 모든 마우스에서 고형암이 성장을 하지만 pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드를 투여한 그룹의 경우에는 암이 전혀 없는 마우스가 각각 62.5%(5/8)와 87.5%(7/8)으로 현저히 암의 성장을 억제하였다(도 8a). 정맥 주사한 경우에는 PBS 그룹과 pCK 벡터 그룹에서 17일 이내에 모든 마우스가 암세포의 폐 전이로 사망하였으나 pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드를 투여한 그룹의 경우에는 생존율을 현저히 증가시켰다(도 8b). pTV2 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 pNeu 플라스미드의

경우와 마찬가지로 pCK 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 플라스미드의 경우에도 뛰어난 항암 효과가 있음을 확인하였다.

<75> 실시예 5: pNeuECD와 pNeuECD-gDs에 의한 항암 면역 비교

<76> 본 실험에서는 피하 주사하는 암세포의 수를 100배(5×10^6 개/마우스) 증가시키고, 정맥 주사하는 암세포의 수를 40배(2×10^6 개/마우스) 증가시켰다. 이 때 정맥주사하는 방법에 있어서는 정맥으로 투여된 암세포 수가 과다한 경우 혈관 폐쇄가 일어날 우려가 있으므로 세포의 수를 2×10^6 개 이상은 사용할 수가 없었다. 비교를 위해서 4가지 서로 다른 Her-2/neu 발현 플라스미드 중에서 Her-2/neu 특이적인 항체 역가의 차이가 가장 큰 pNeuECD와 pNeuECD-gDs를 선정하였다.

<77> 마우스는 면역화 계획(도 1b)에 따라서 $100\mu\text{g}$ 의 플라스미드 DNA를 3회 접종한 뒤 10일 후, 각각의 마우스에 Her-2/CT26 세포를 5×10^6 개 피하 주사하거나 2×10^6 개 정맥 주사하였다. 피하주사 모델에 있어서, pTV2를 주사한 모든 마우스(8/8)에서 암이 발생하였으며, 평균 암 부피는 암을 피하 주사한 후 19일이 지나기 전에 평균 암 부피가 2000mm^3 이상이 되었다. pNeuECD를 접종한 8마리 마우스의 경우 23일째 평균 암 부피는 82.2 mm^3 이었으며, pNeuECD-gDs로 접종한 8마리 마

우스의 경우 67.9 mm^3 이었다. $p\text{NeuECD}$ ($p=2.9900\text{e-}8$, the Students t test) 또는 $p\text{NeuECD-gDs}$ ($p=2.8400\text{e-}8$, the Students t test)를 접종한 마우스의 경우 현저한 암 성장 억제가 나타났지만, 각각의 플라스미드로 면역화한 두 그룹의 평균 암 부피의 차이는 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 ($P=0.8684$, the Students t test). 암전이 모델의 경우, $p\text{NeuECD}$ 를 접종한 마우스는 40일까지 100%(8/8) 마우스에서, $p\text{NeuECD-gDs}$ 를 접종한 마우스는 88%(7/8) 마우스에서 암의 폐 전이가 억제되었다. $p\text{TV2}$ 를 접종한 모든 마우스는 폐 전이를 극복하지 못했다. 즉, $p\text{NeuECD}$ ($p<0.0001$, Mantel-Haenszel test) 또는 $p\text{NeuECD-gDs}$ ($p<0.0001$, Mantel-Haenszel test)로 처리한 경우 $p\text{TV2}$ 에 비해서 생존이 연장되었으나, $p\text{NeuECD}$ 와 $p\text{NeuECD-gDs}$ 사이에는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 ($p=0.3173$, Mantel-Haenszel test)(도 9a 및 도 9b).

<78> 실시예 6: 치료모델에서 Her-2/neu DNA 백신의 효과

<79> 먼저 암세포를 투여한 마우스에 DNA 플라스미드를 접종하는 치료 모델에서 $p\text{NeuECD}$ 와 $p\text{NeuECD-gDs}$ 의 항암 면역 효과를 다음과 같은 방법으로 비교측정하였다. 6주령 된 마우스에 1×10^5 개 또는 5×10^5 개의 Her-2/neu 세포를 정맥 주사한 후에 4 그룹으로 나누었다. 암세포를 접종한 후 1시간 뒤에, 각각의 마우스에 $p\text{NeuECD}$ 또는 $p\text{NeuECD-gDs}$ $100\mu\text{g}$ 을 근육주사하고, 같은 DNA를 4일 동안 매일 접종하였다.

<80> 1×10^5 개의 암세포를 미리 접종한 경우, $p\text{NeuECD}$ 또는 $p\text{NeuECD-gDs}$ 를 접종한 모든 마우스가 40일 동안 폐 전이를 극복하고 살아 남았다(도 10a). 그러나 $p\text{TV2}$ 만을 접종한 마우스의 63%(5/8)는 폐 전이로 죽었으며, PBS만 접종한 경우에는 모든 마우스(8/8)

가 폐 전이로 죽었다. pNeuECD와 pNeuECD-gDs는 pTV2와 비교할 때 유의성 있는 정도로 생존을 증가시켰으나($p=0.0085$, Mantel-Haenszel test), pNeuECD와 pNeuECD-gDs 사이에는 유의성있는 차이가 없었다.

<81> 반면 접종하는 암세포 수를 5배 증가한 경우(5×10^5 개), pNeuECD를 접종한 마우스만이 pTV2를 접종한 마우스에 비하여 통계적으로 유의성 있는 정도로 생존이 증가하였고($p=0.0237$, Mantel-Haenszel test, 도 10b), pNeuECD-gDs를 접종한 마우스의 경우는 유의성 있는 정도로 생존율이 증가되지 않았다($p=0.4628$, Mantel-Haenszel test). 그럼에도 불구하고 pNeuECD와 pNeuECD-gDs의 항암 면역 사이에 유의성 있는 차이가 없다는 사실은 예방실험 모델의 결과와 일치하였다($p=0.4263$, Mantel-Haenszel test).

<82> 또한, pNeuECD와 pNeuTM을 pCK 벡터로 치환한 pCKECD와 pCKTM 플라스미드의 경우에도 2×10^5 개의 Her-2/CT26 세포를 정맥 주사하고 상기와 동일한 방법으로 DNA를 투여하여 치료 효과시험을 수행하였다. PBS 그룹과 pCK 벡터 그룹에서 21일 이내에 모든 마우스가 암세포의 폐 전이로 사망하였으나 pCKECD와 pCKTM 플라스미드를 투여한 그룹의 경우에는 생존율이 현저히 증가함을 알 수 있었다(도 11). pTV2 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 pNeu 플라스미드의 경우와 마찬가지로 pCK 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 플라스미드의 경우에도 상당한 항암 치료 효과가 있음을 확인하였다.

【발명의 효과】

<83> 본 발명의 Her-2/neu DNA 백신은 암 수술 후 전이를 감소시키는 치료 백신 및 유전적으로 위험성이 있는 사람을 위한 예방적 백신으로서 유용하게 응용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

세포 내 영역이 제거된 서열번호: 2의 인간 Her-2/neu 유전자를 플라스미드 pTV2 또는 pCK에 삽입하여 제조된, 항암 효과를 갖는 플라스미드.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

인간 Her-2/neu 유전자에서 막관통 영역이 추가로 제거된 서열번호: 3의 유전자를 포함하는 플라스미드.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

인간 Her-2/neu 유전자의 신호 펩타이드를 허피스 심플렉스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 펩타이드 서열로 치환한 플라스미드.

【청구항 4】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

플라스미드 pNeu_{TM}(KCCM-10393), pNeu_{ECD}(KCCM-10394), pCK_{TM}(KCCM-10396), pCK_{ECD}(KCCM-10395), pNeu_{TM}-gDs 및 pNeu_{ECD}-gDs로 이루어진 그룹으로부터 선택된 플라스미드.

【청구항 5】

제 1 항의 플라스미드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

1020020041764

【청구항 6】

제 5 항에 있어서,

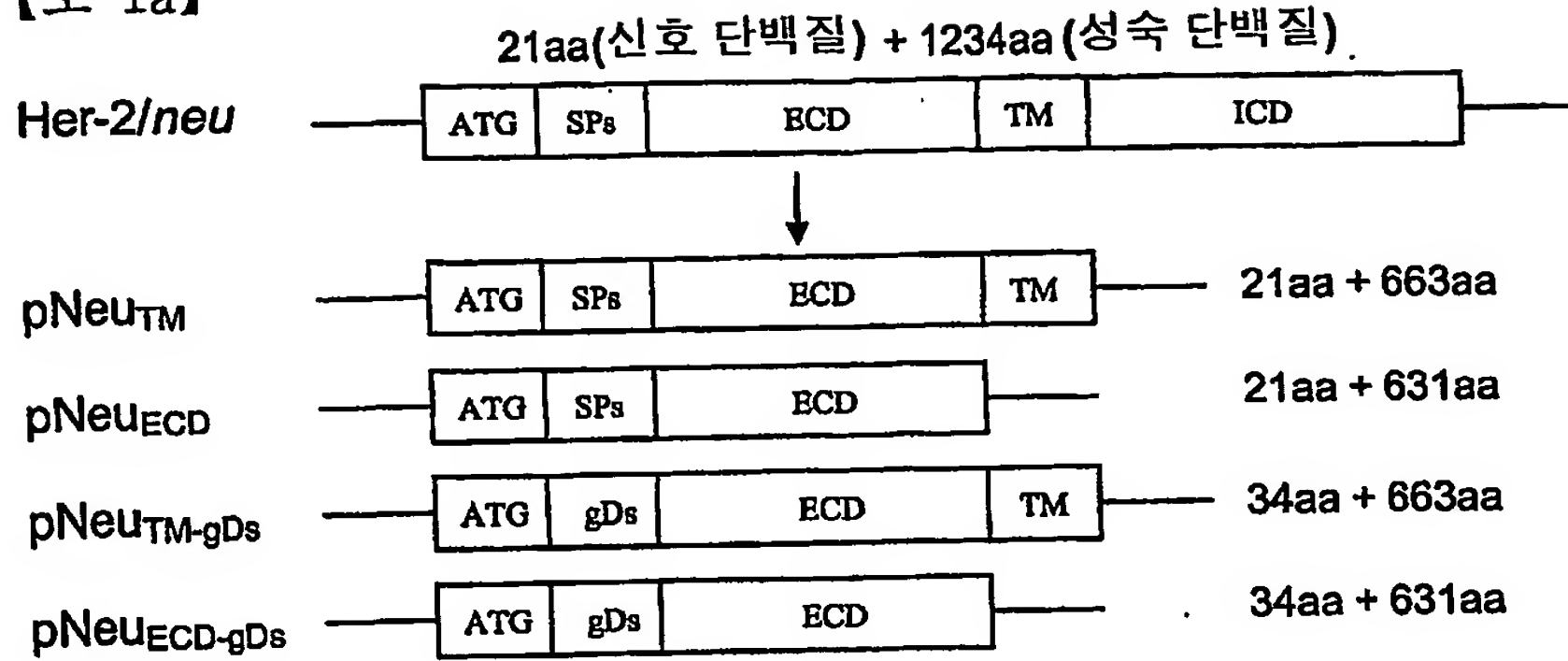
제 1 항의 플라스미드를 주사용 매질에 현탁시킨 주사제의 형태인 조성물.

【청구항 7】

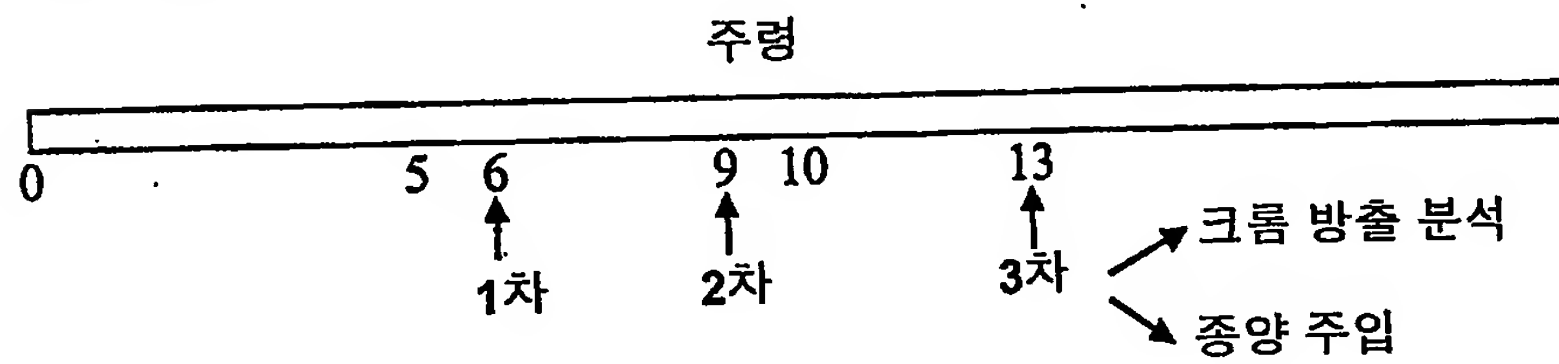
제 1 항의 플라스미드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 백신.

【도면】

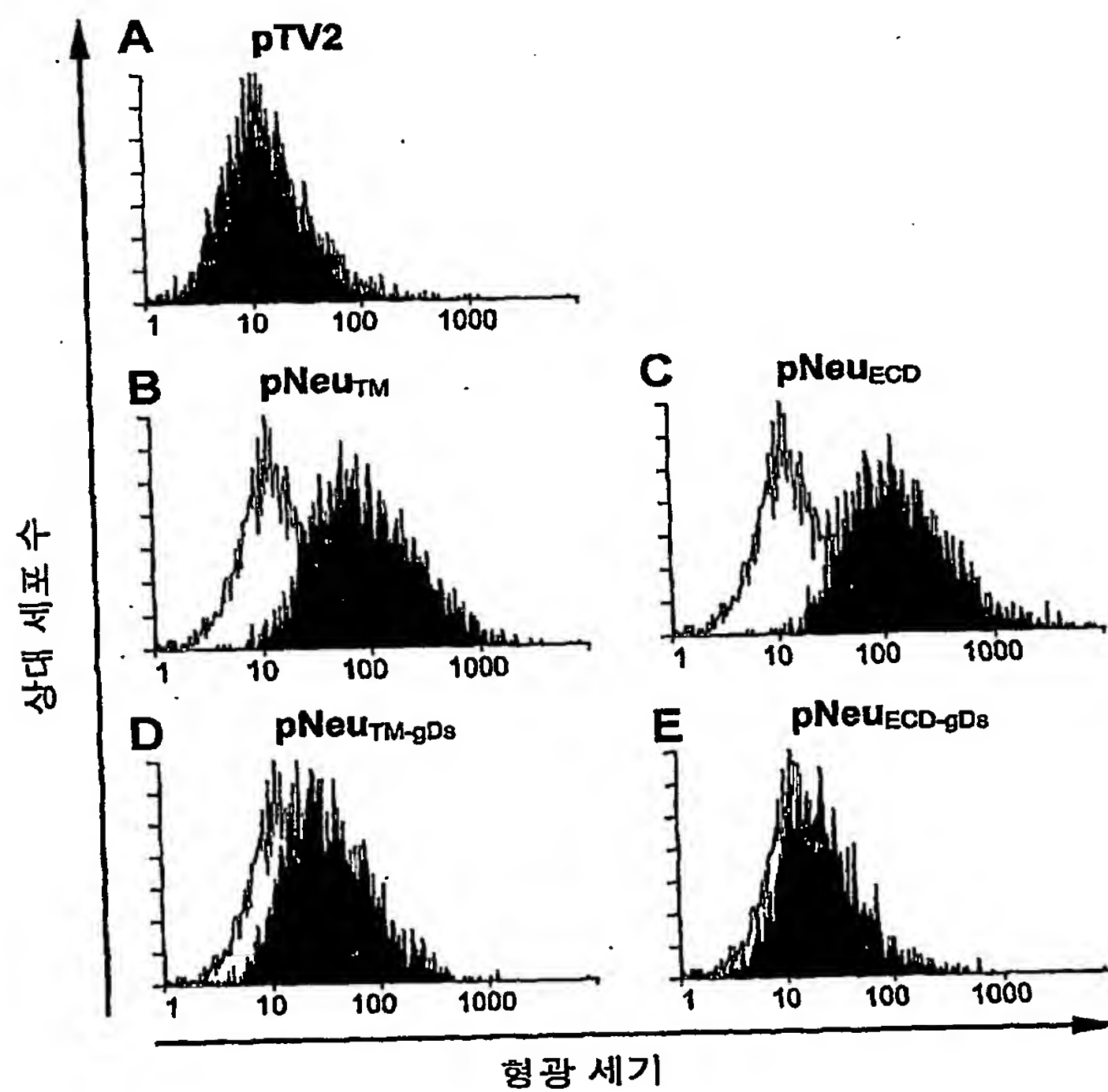
【도 1a】



【도 1b】

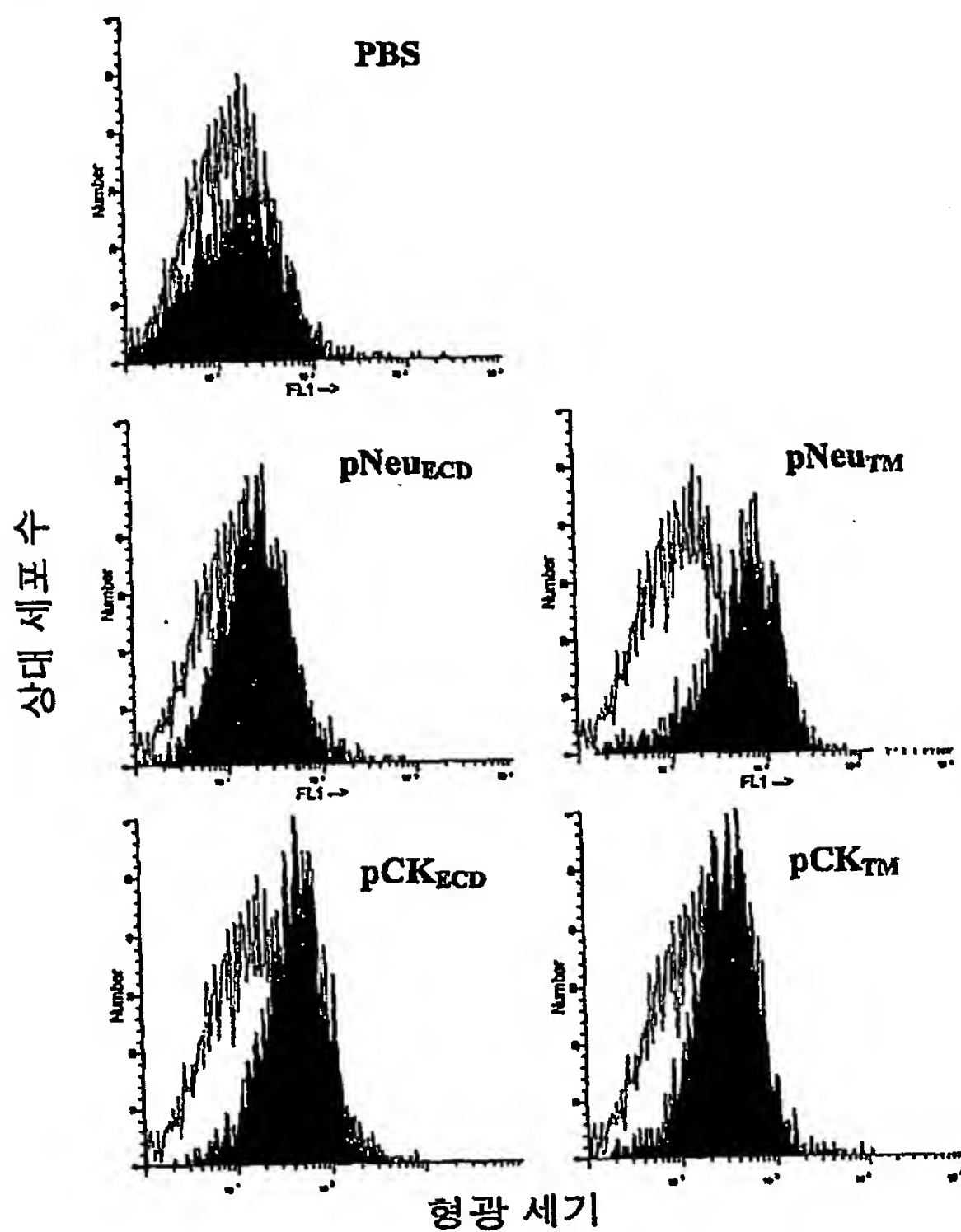


【도 2】



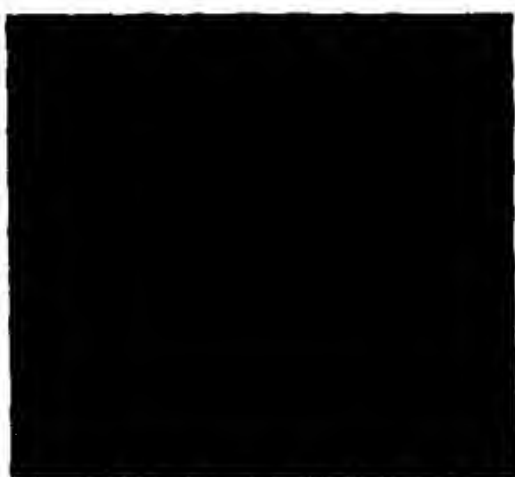
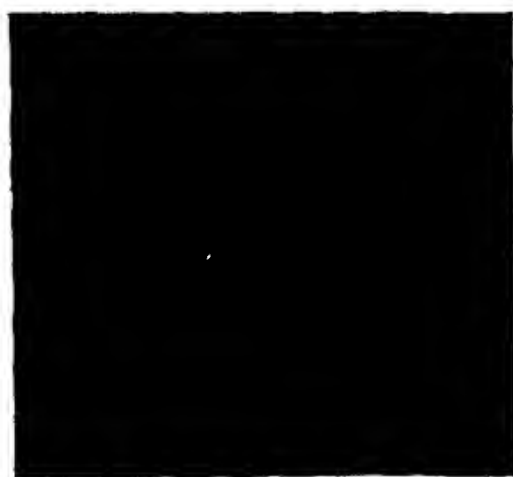
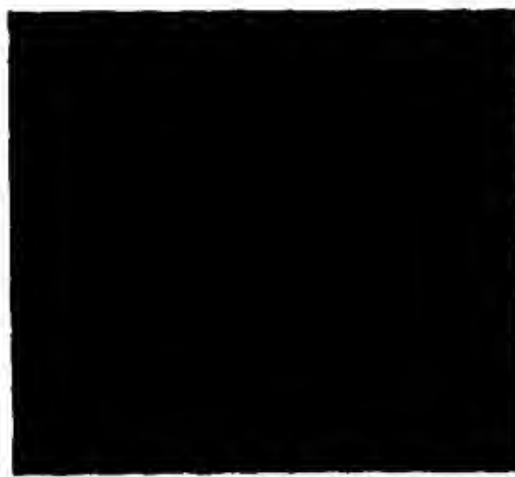
BEST AVAILABLE COPY

【도 3】



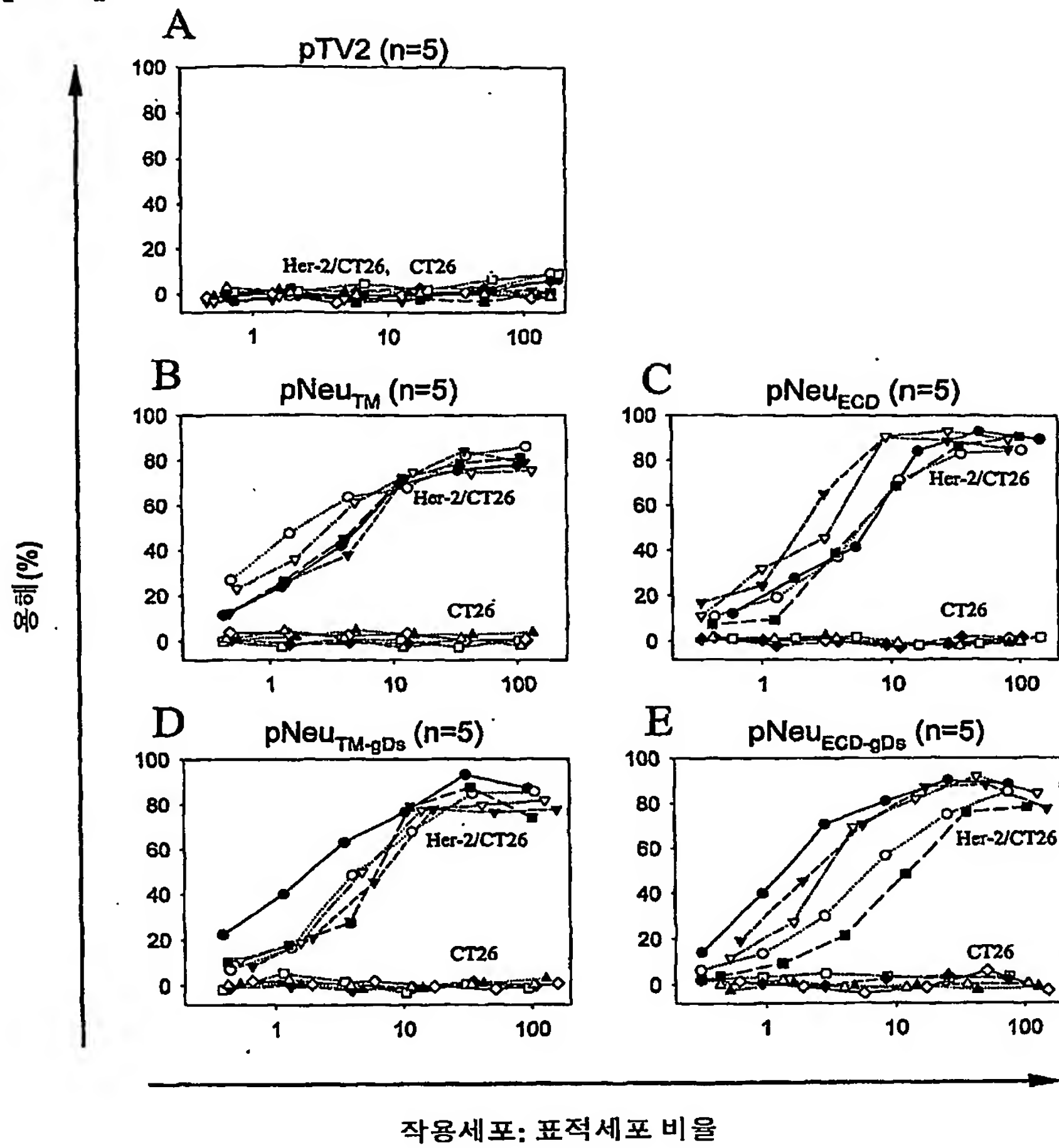
【도 4】

A pTV2

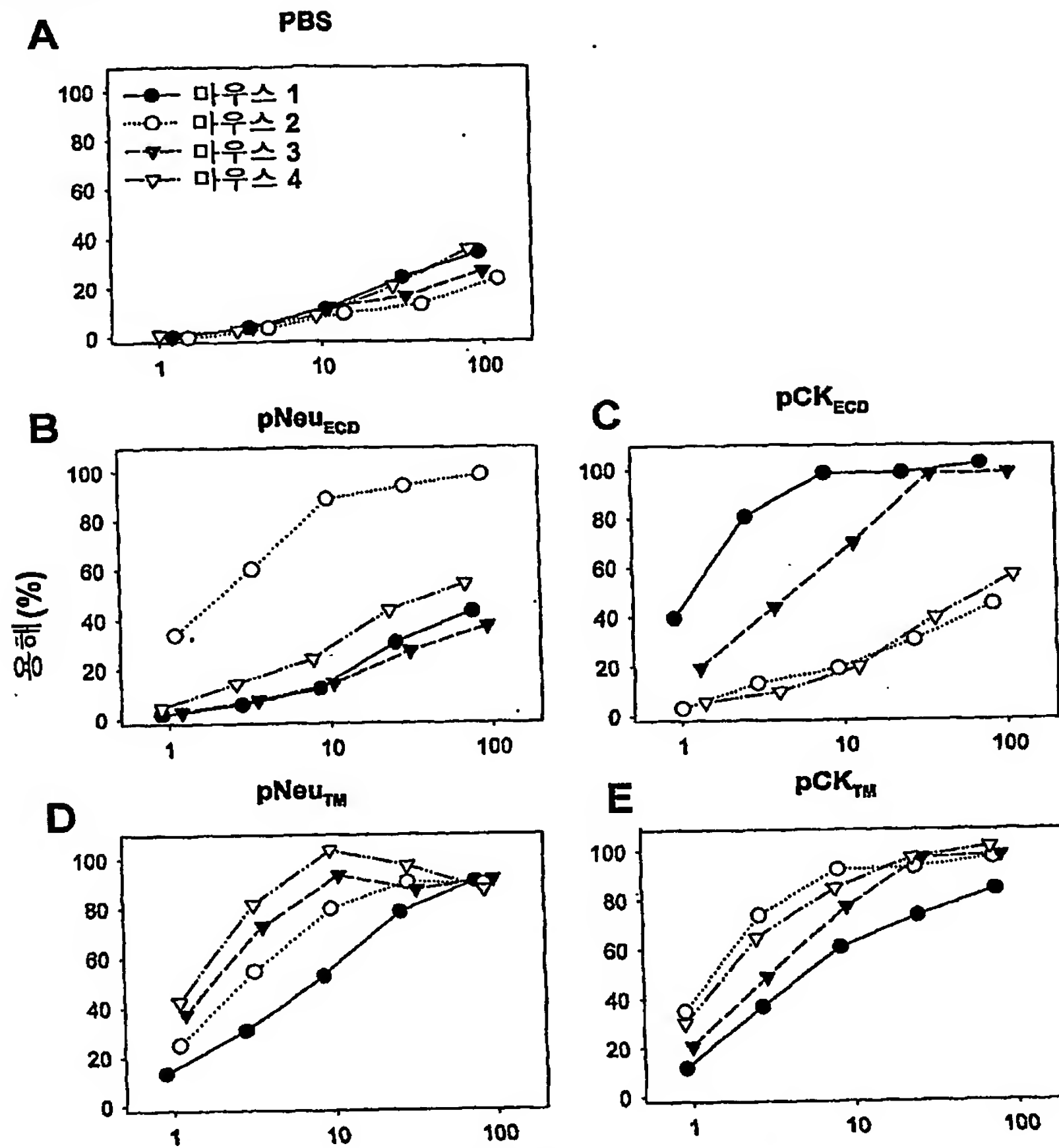
B pNeu_{TM}C pNeu_{ECD}-gDs

BEST AVAILABLE COPY

【도 5】

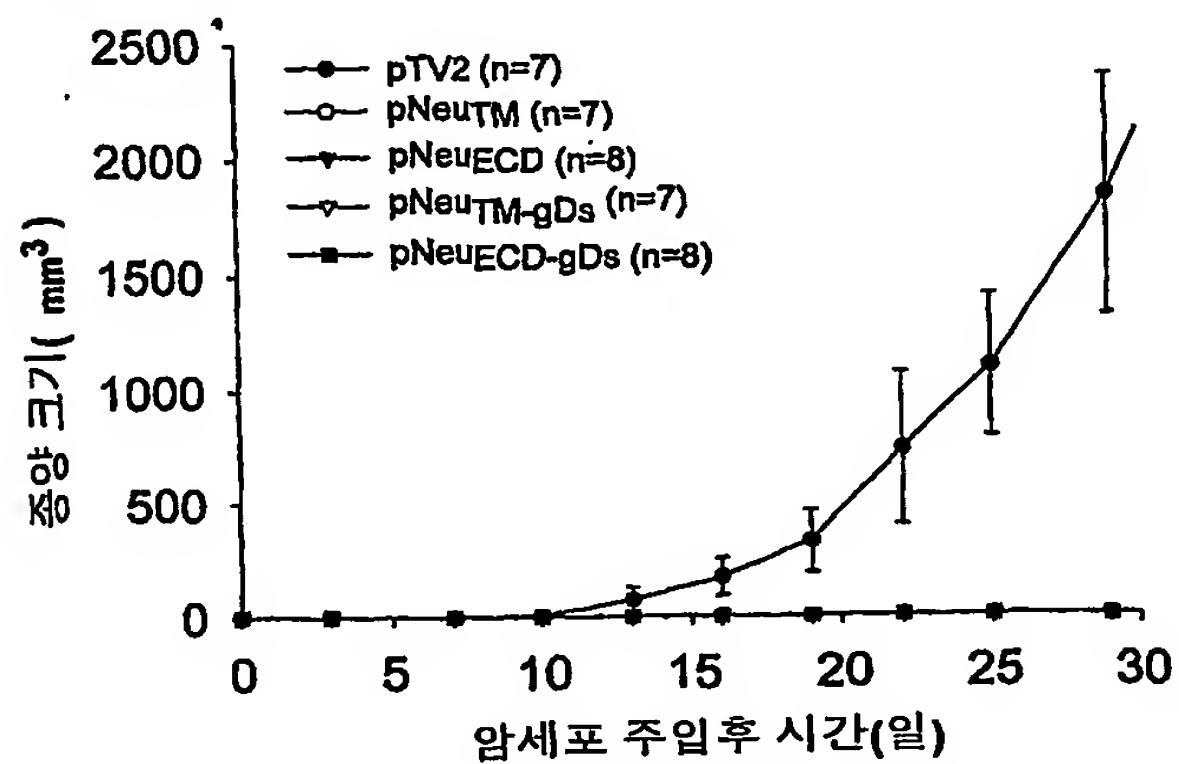


【도 6】

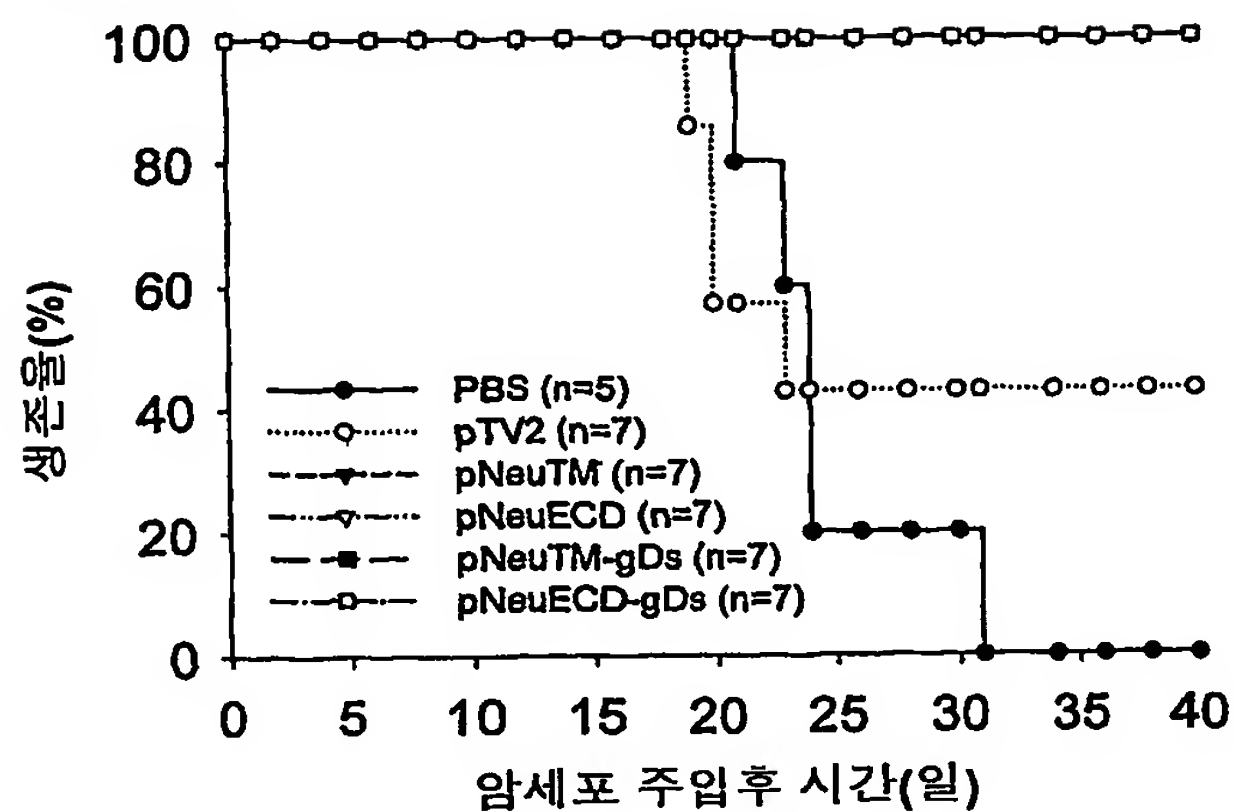


작용세포: 표적세포 비율

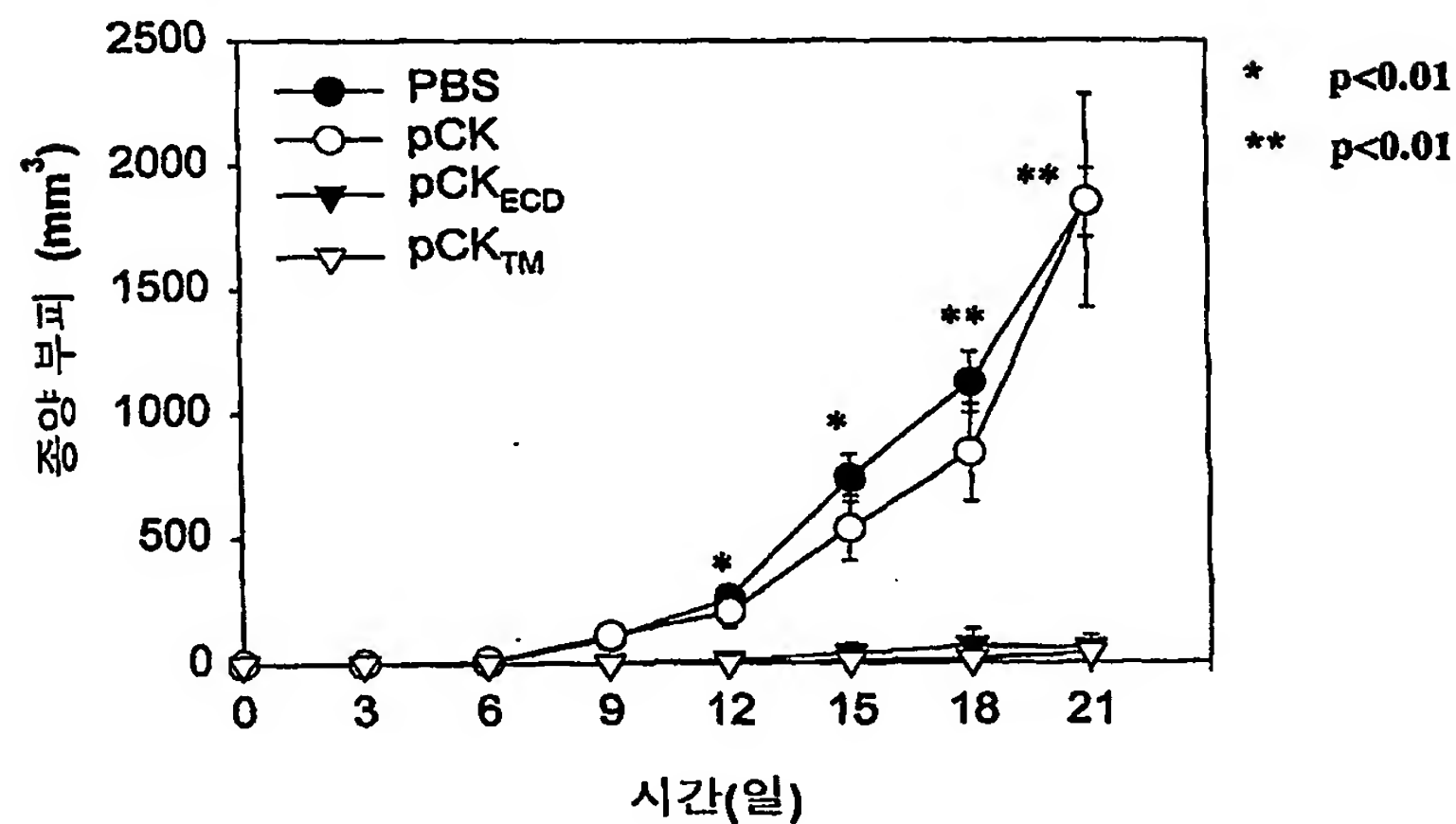
【도 7a】



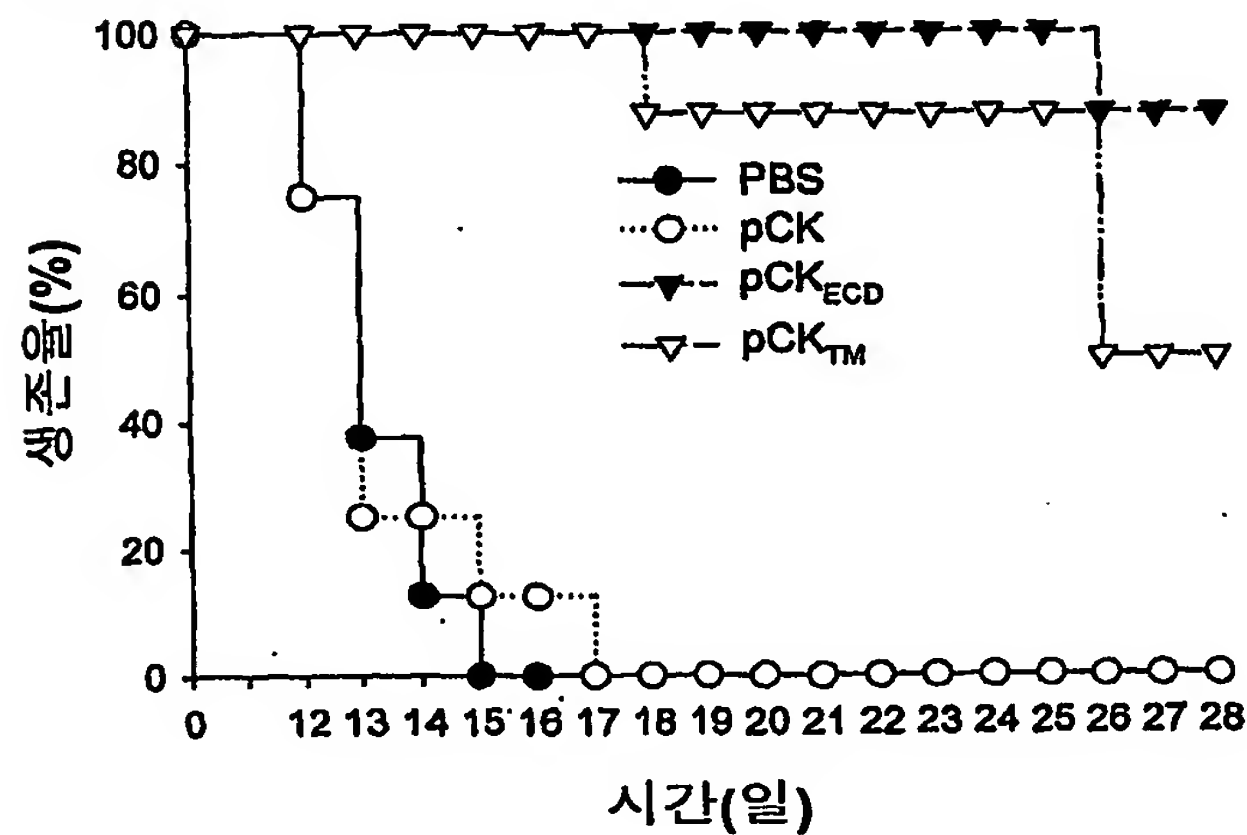
【도 7b】



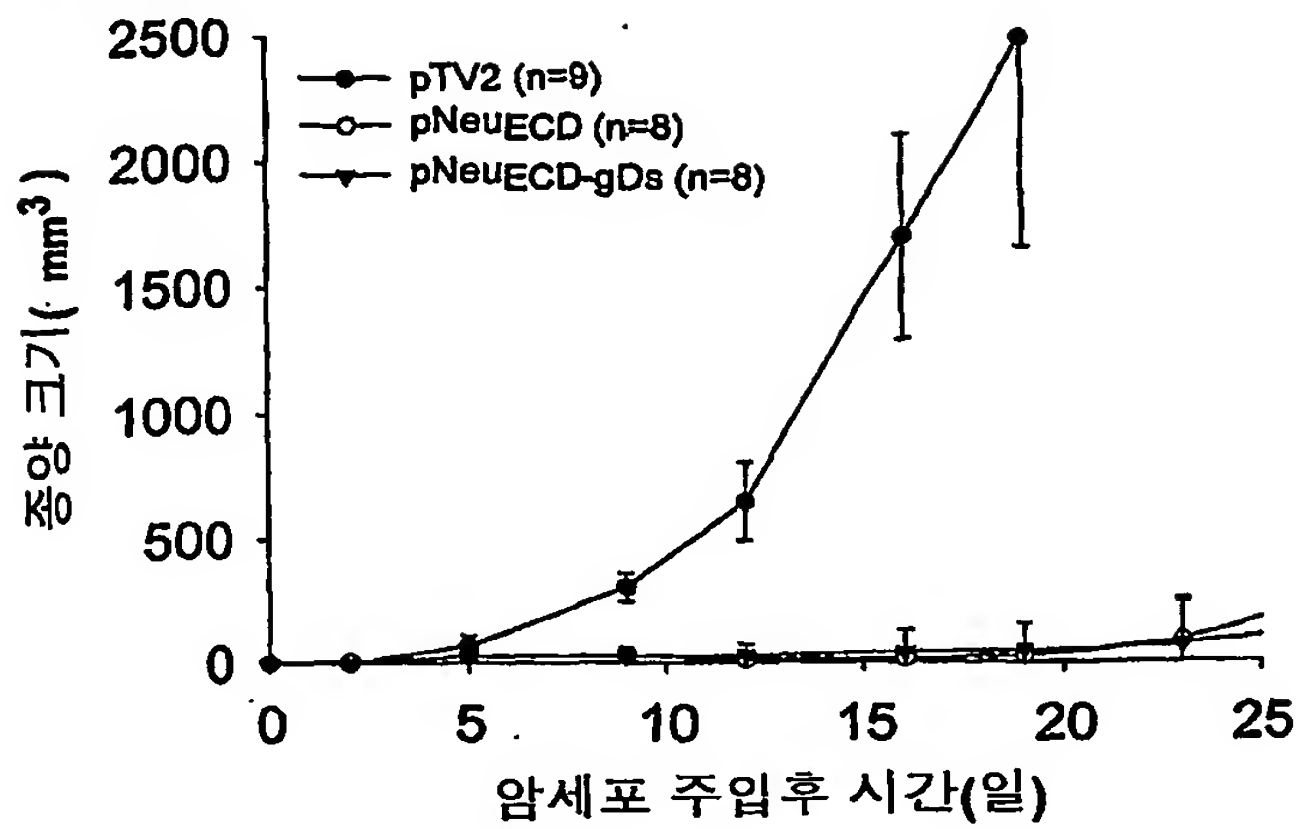
【도 8a】



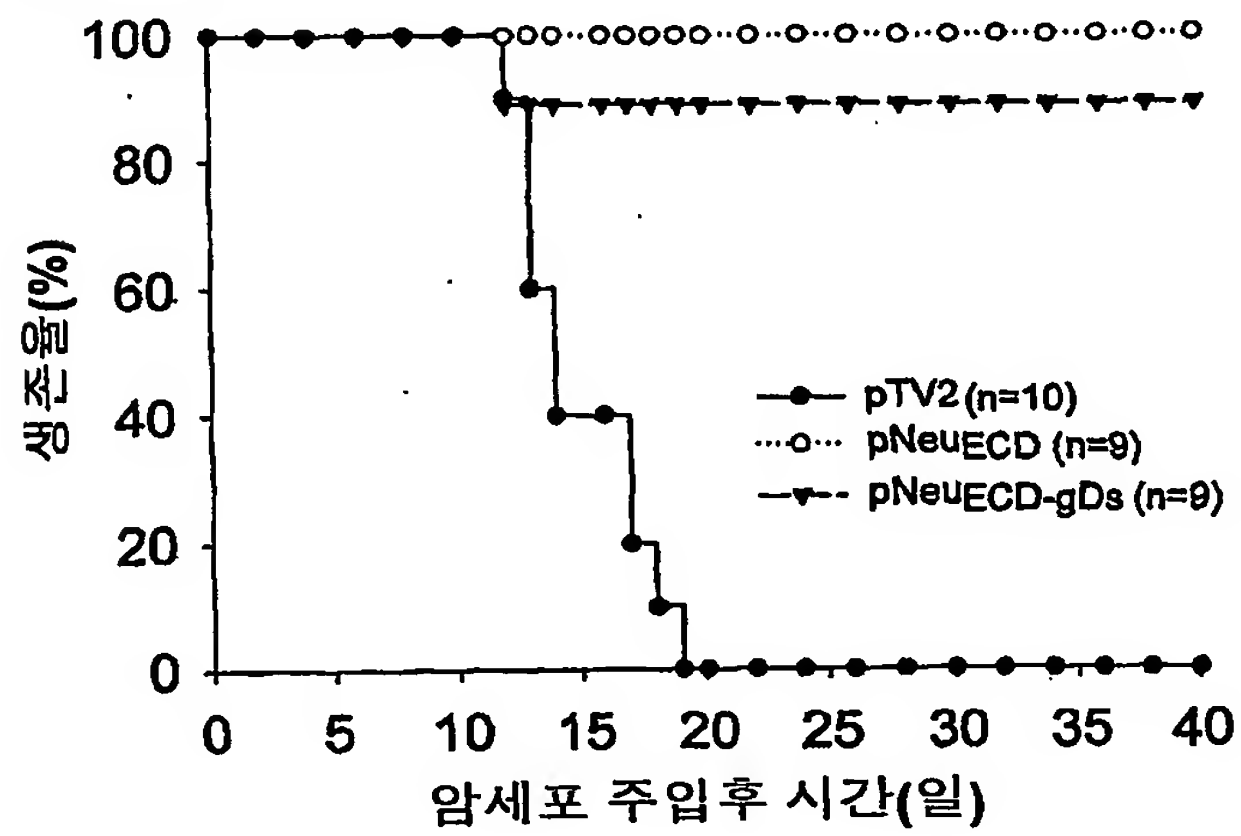
【도 8b】



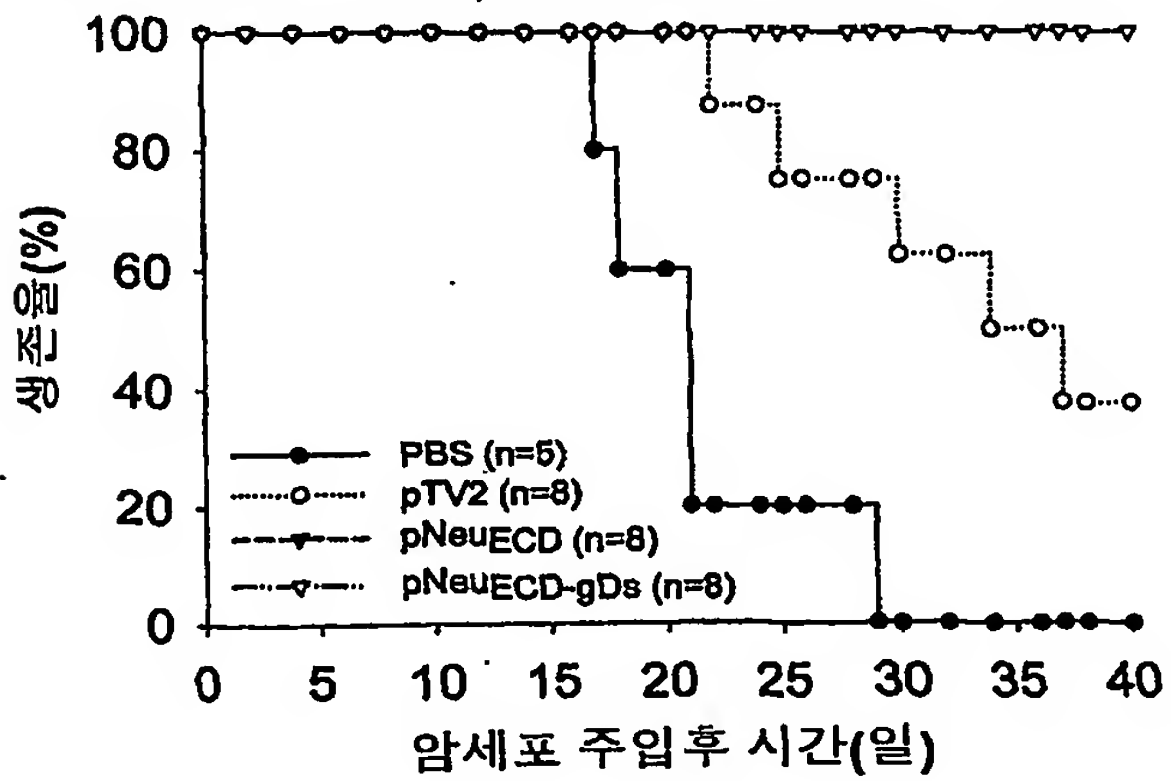
【도 9a】



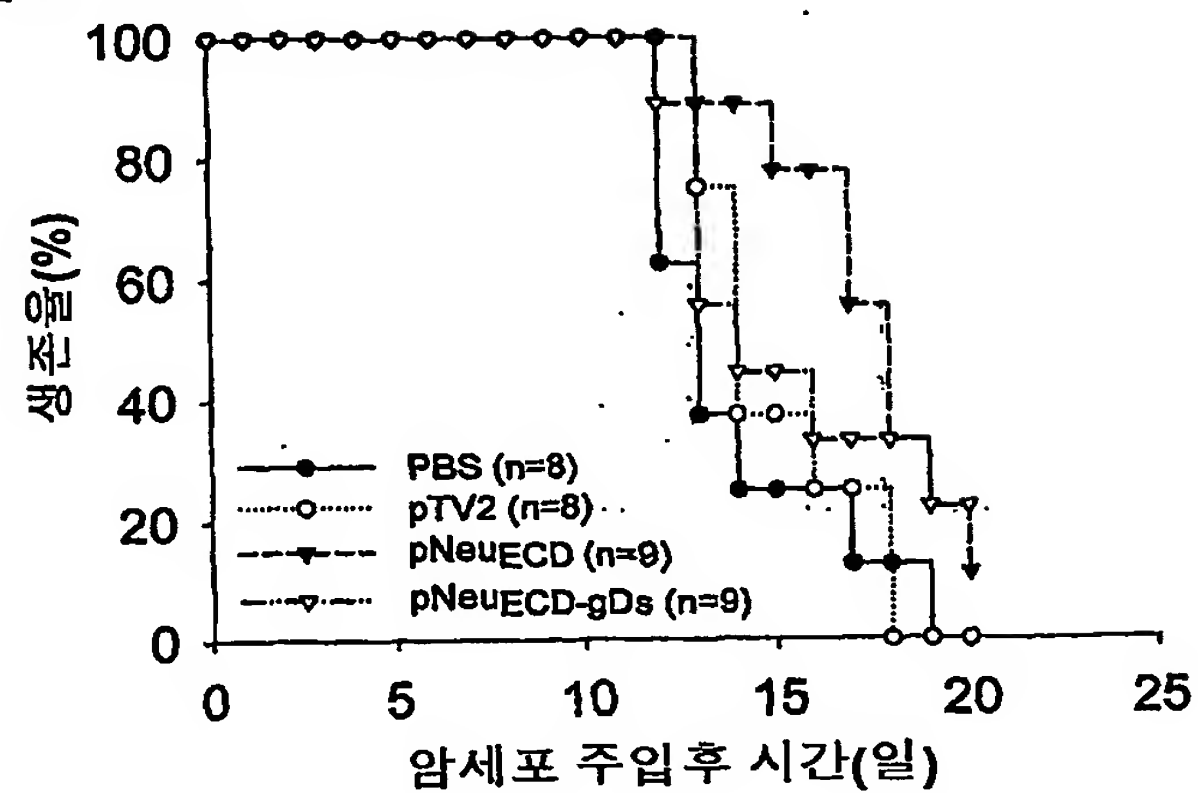
【도 9b】



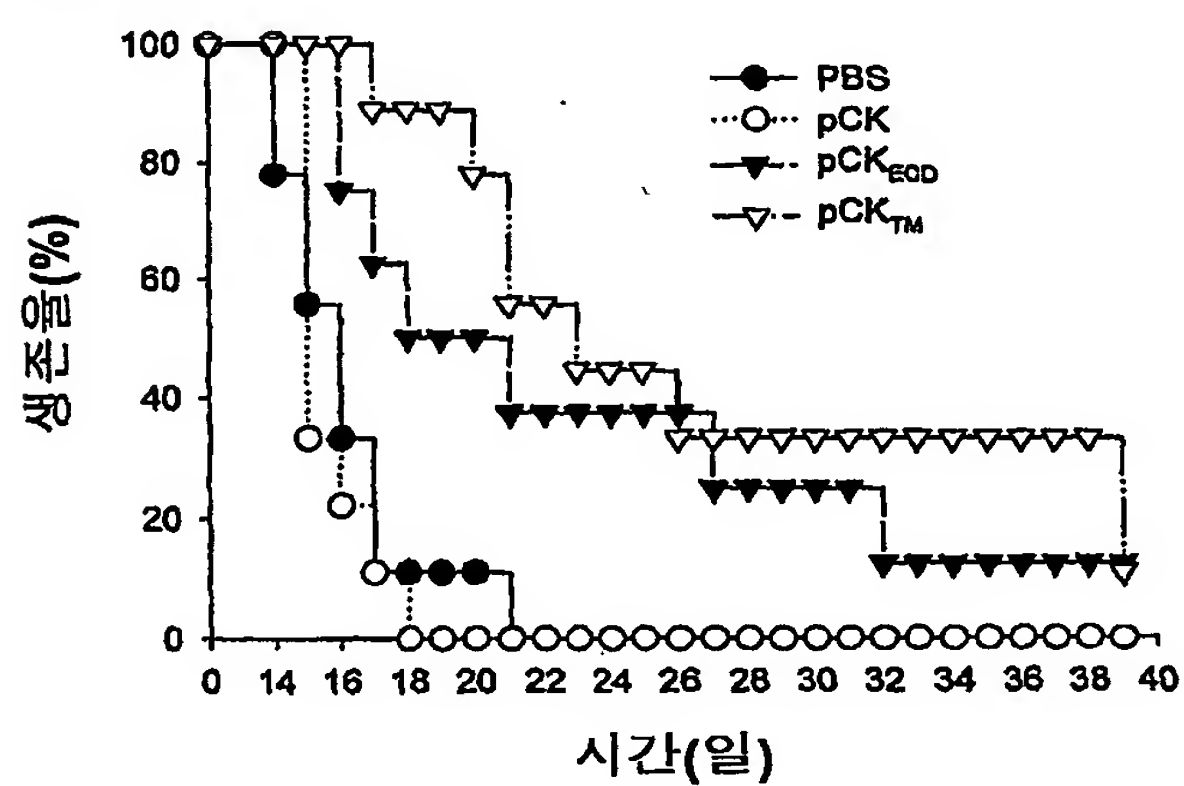
【도 10a】



【도 10b】



【도 11】



【서열목록】

<110> PANGENOMICS Co., Ltd <120> Her-2/neu DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER EFFEC